

Отзыв

**официального оппонента Андрея Александровича Замятнина на
диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических
наук Рината Асхатовича Ханнанова «Тонкая регуляция
митохондриальной трансляции в клетках пекарских дрожжей» по
специальности 1.5.3. Молекулярная биология**

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Рината Асхатовича Ханнанова посвящена исследованию новых механизмов регуляции трансляции в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae*, в частности – экспериментальной проверке ранее выдвинутой гипотезы о гетерогенности белкового состава митохондриальных рибосом в зависимости от того, какую именно мРНК они транслируют. В работе также осуществлена оценка функциональности человеческих гомологов дрожжевого фактора терминации митотрансляции Mrflp и факторов спасения миторибосомы в митохондриях пекарских дрожжей.

Актуальность избранной темы диссертационной работы определяется возрастающим интересом научного сообщества к проблеме функциональной специализации митохондрий, что предполагает наличие у них собственных специфических механизмов тонкой настройки и регуляции. Несмотря на то, что синтез белка в митохондриях осуществляется по классической схеме, включающей стадии инициации, элонгации, терминации и рециклирования, каждая из которых реализуется посредством серии молекулярных взаимодействий между митохондриальными рибосомами, мРНК, аминоацил-тРНК и набором регулирующих факторов трансляции, митохондриальная трансляционная система обладает высокой степенью специализации. Она адаптирована для синтеза ограниченного набора гидрофобных мембранных полипептидов и в силу этого приобрела ряд уникальных особенностей,

отличающих её от универсальной цитоплазматической системы трансляции. В настоящее время исследования таких особенностей проводятся во многих научных коллективах по всему миру.

Научная новизна, обоснованность и достоверность выносимых на защиту положений, научных выводов и рекомендаций исследования

Диссертационная работа отличается глубоким и системным подходом к изучению гетерогенности белкового состава митохондриальных рибосом в клетках пекарских дрожжей и демонстрирует высокую степень научной новизны. Автор разработал и апробировал оригинальный метод выделения миторибосомных комплексов с помощью ко-иммунопреципитации, что позволило ему впервые получить и охарактеризовать специализированные субпопуляции рибосом, ассоциированных с трансляцией определённых индивидуальных мРНК. Этот подход существенно расширяет возможности панорамного протеомного анализа, позволяя не только оценивать качественно-количественный белковый состав миторибосомных фракций, но и выявлять уникальные особенности их функционирования в митохондриях дрожжей.

К числу положений, выносимых на защиту, относятся экспериментально подтверждённая неоднородность белкового состава митохондриальных рибосом, выявление в их составе белков, присутствующих в неэквивалентных количествах, а также обнаруженное функциональное сопряжение трансляции мРНК COX2 и COX1, кодирующих ключевые компоненты дыхательной цепи митохондрий. Таким образом, в диссертационной работе подчёркивается сложность архитектурной и регуляторной организации митохондриального трансляционного аппарата. Установленные различия в количественном составе ряда рибосомных белков и их распределении определенно указывают на существование ранее не описанных механизмов контроля синтеза белка.

Крайне интересным выносимым на защиту положением является частичная функциональная комплементарность человеческих гомологов фактора терминации митохондриальной трансляции дрожжей, а именно их способность поддерживать стабильность митохондриального генома у штаммов дрожжей с удаленным эндогенным фактором терминации митотрансляции. Этот результат существенно углубляет наше понимание явлений эволюционной консервативности и межвидовой специфики регуляции трансляции в митохондриях. С другой стороны, выявлены принципиальные ограничения функциональной совместимости факторов митотрансляции между видами, что открывает новые направления для дальнейших исследований в области молекулярной биологии митохондрий.

В целом, представленные в работе подходы, экспериментальные результаты и выводы из них вносят существенный вклад в развитие современного понимания структуры, функционирования и эволюции митохондриальных рибосом эукариотических организмов.

Структура и общая характеристика диссертационной работы.

Рукопись диссертационной работы имеет традиционную структуру и изложена на 137 страницах. Она состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, список сокращений, список использованной литературы (122 источника) и дополнительные материалы (4 приложения). Рукопись включает 7 таблиц и 24 рисунка.

Обзор литературы знакомит читателя с тематикой исследования, повествуя в доступной форме об этапах исследования митохондрий, рассказывает о стадиях биосинтеза белка в митохондриях дрожжей и млекопитающих и о его особенностях у разных организмов. Особое внимание уделяется описанию активаторов трансляции – уникального семейства белков дрожжевых митохондрий.

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методологическом уровне, с использованием современных методов и подходов молекулярной биологии. Глава «Материалы и методы» написана подробно, с детальным и логическим изложением используемых экспериментальных методов.

В главе «Результаты и обсуждение» детально представлены экспериментальные данные с чёткой, аргументированной и научно обоснованной интерпретацией. Ринатом Асхатовичем наглядно продемонстрированы различия в белковом составе популяций миторибосом пекарских дрожжей, в частности зависящие от типа транслируемой мРНК. На примере коиммунопреципитата, полученного с использованием тегированного активатора трансляции Pet111p, автор показал характерные отличия белкового профиля миторибосомного комплекса, участвующего в трансляции мРНК *COX2* в сравнении с белковыми профилями коиммунопреципитатов, полученных с использованием в качестве якоря коровых миторибосомных белков, таких как MRPL8 и MRPS17. Также автором впервые была проведена гуманизация митохондриального фактора высвобождения миторибосом *S. cerevisiae* и произведена оценка комплементарности человеческих гомологов в клетках пекарских дрожжей. В частности, показано участие человеческих гомологов (MTRF1 и MTRF1A) в поддержании митохондриальной ДНК в гуманизированных клетках *S. cerevisiae*.

Заключение и выводы в полной мере обоснованы представленными данными, полученными в ходе выполнения диссертационного исследования.

Замечания и вопросы

1. Положение 1, выносимое на защиту (Рибосомы в митохондриях пекарских дрожжей неоднородны по своему белковому составу, и эта неоднородность по крайней мере частично связана со способностью

рибосом транслировать ту или иную мРНК), следует из результата Положения 2, выносимого на защиту (Многие миторибосомные белки в митохондриях дрожжей представлены не в эквимоллярных друг другу количествах) фактически являются одним. Соответственно, как мне кажется, выводы 1 и 2 также можно было бы объединить в один.

2. В конце Литературного обзора хотелось бы видеть абзац, связующий Литературный обзор с диссертационной работой.
3. В главе Материалы и Методы отсутствует специальный раздел, посвященный материалам, содержащим сведения о производителях реагентов и материалов, использованных в работе. В самой главе производители материалов и реагентов, используемых в работе, указаны только в отдельных случаях.
4. В работе недостаточно обсужден ключевой дискуссионный вопрос о природе предсказанных субпопуляций рибосом. Остается неясным, представлены ли эти субпопуляции структурно различными рибосомами или же структурно идентичными рибосомами, несущими различные вспомогательные белки или «адаптеры». Наиболее же интересным представляется вопрос о динамике: возможен ли переход рибосом из одного состояния в другое (например, путем смены ассоциированных факторов)?
5. Работа имеет безупречную механистическую составляющую. Однако для целостной картины не хватает физиологического контекста. Было бы ценно увидеть обсуждение автором того, как открытые механизмы регуляции могут участвовать в адаптации дрожжей к изменениям среды, таким как стресс, смена источника питания и т.д.
6. Текст диссертации содержит ряд опечаток и неудачных выражений, часть из которых приведена ниже:

Стр 7: «электронной крио-электронной микроскопии»

Стр 7: «пролил свет на структуру»

Стр 7: «Анализ этих структур показал, что, несмотря на эволюционное происхождение от бактериальных рибосом, митохондриальные рибосомы значительно отличаются от них по составу, структуре и функциям»

Стр 25: «Инициация трансляции возможна только с малой субъединицей рибосомы.»

Стр 26: «функция также делегирована второму фактору, вернее дополнительной вставке из 37 аминокислотных остатков»

Стр 56: «Гуманизированные дрожжи»

Стр 57: «высеивали три последовательных десятикратных разведения суспензий анализируемых штаммов/клонов дрожжей, начиная с наибольшего значения $OD_{600} = 0,1$.»

Стр 57: «Свежую питательную среду YPD инокулировали ночной культурой дикого типа дрожжей до конечной оптической плотности $OD_{600} = 0,1$, а также добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 25 мкг/мл.»

Стр 58: «Клетки дрожжей разводили дистиллированной водой...»

Стр 59: «Плазмидные конструкции»

Стр. 104: «штамма-делетанта»

Следует отметить, что указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о

совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ханнанов Ринат Асхатович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», и.о. декана, профессор факультета биоинженерии и биоинформатики

Замятнин Андрей Александрович

Контактные данные:

e-mail: zamyat@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.03 – молекулярная биология; 03.02.02 – вирусология

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 73

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет биоинженерии и биоинформатики.